

NUCLEIC ACID PROBE FOR DETECTING BACTERIUM BELONGING TO THE GENUS PECTINATUS AND METHOD OF DETECTING BEER MUDDINESS CAUSAL BACTERIUM

Publication number: JP2001145492

Publication date: 2001-05-29

Inventor: YASUHARA TAKAOMI

Applicant: ASAHI BREWERIES LTD

Classification:

- international: C12N15/09; C12Q1/68; G01N33/14; C12N15/09;
C12Q1/68; G01N33/02; (IPC1-7): C12N15/09;
C12Q1/68; G01N33/14; C12N15/09; C12R1/01

- european:

Application number: JP19990329428 19991119

Priority number(s): JP19990329428 19991119

[Report a data error here](#)

Abstract of JP2001145492

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a nucleic acid sequence which can be used on an assay for detecting the presence of the genus Pectinatus bacteria and its evolutionary relative bacteria and combines preferentially with the rRNA or rDNA of microorganisms causing beer muddiness.

SOLUTION: This nucleic acid sequence is a sequence targeting the 16 S rDNA and 16 S rRNA of the genus Pectinatus bacteria in order to selectively detect the bacteria belonging to the genus Pectinatus bacteria and its oligonucleotide is a single strand oligonucleotide characterized by containing a specific sequence or a correspondent complementary chain.

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2001-145492

(P2001-145492A)

(43)公開日 平成13年5月29日(2001.5.29)

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テームコード(参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 Q 1/68	A 4 B 0 2 4
C 1 2 Q 1/68		G 0 1 N 33/14	4 B 0 6 3
G 0 1 N 33/14		C 1 2 R 1:01)	
// (C 1 2 N 15/09	Z N A	(C 1 2 Q 1/68	
C 1 2 R 1:01)		C 1 2 R 1:01)	
審査請求 未請求 請求項の数17 O L (全 9 頁) 最終頁に続く			

(21)出願番号 特願平11-329428

(22)出願日 平成11年11月19日(1999.11.19)

(71)出願人 000000055

アサヒビール株式会社

東京都中央区京橋3丁目7番1号

(72)発明者 安原 貴臣

茨城県北相馬郡守谷町緑1-1-21 アサ

ヒビール株式会社酒類研究所内

(74)代理人 100083714

弁理士 舟橋 榮子

Fターム(参考) 4B024 AA11 BA80 CA09 CA11 GA27

HA12

4B063 QA01 QQ06 QQ52 QR35 QR55

QR75 QS03 QS34 QS36 QX02

(54)【発明の名称】 ペクチネータス属の細菌検出用核酸プローブおよびビール混濁原因菌の検出方法

(57)【要約】

【課題】 ペクチネータス属菌およびその進化的近縁細菌の存在を検出するためのアッセイにおいて用いることが出来、ビール混濁の原因となる微生物のrRNAもしくはrDNAに優先的に結合する核酸配列を提供すること。

【解決手段】 ペクチネータス属菌に属する菌を選択的に検出するため、ペクチネータス属菌の16S rDNAならびに16S rRNAを標的とする配列であって、そのオリゴヌクレオチドが特定の配列を有するか、または対応する相補鎖を有することを特徴とする一本鎖オリゴヌクレオチド。

【特許請求の範囲】

【請求項1】ペクチネータス（*Pectinatus*）属菌に属するペクチネータス・フリシンジェンシス（*P. frisingensis*）菌を選択的に検出するため、ペクチネータス属菌の16SrDNAならびに16S rRNAを標的とする配列であって、そのオリゴヌクレオチドが配列表の配列番号1～3の少なくとも1つを有するか、または対応する相補鎖を有することを特徴とする一本鎖オリゴヌクレオチド。

【請求項2】ペクチネータス（*Pectinatus*）属菌に属するペクチネータス・セレビスフィラス（*P. cerevisiophilus*）菌を選択的に検出するため、ペクチネータス属菌の16SrDNAならびに16S rRNAを標的とする配列であって、そのオリゴヌクレオチドが配列表の配列番号4、5の少なくとも1つを有するか、または対応する相補鎖を有することを特徴とする一本鎖オリゴヌクレオチド。

【請求項3】ペクチネータス（*Pectinatus*）属菌を選択的に検出するため、ペクチネータス属菌の16S rDNAならびに16S rRNAを標的とする配列であって、そのオリゴヌクレオチドが配列表の配列番号6、7の少なくとも1つを有するか、または対応する相補鎖を有することを特徴とする一本鎖オリゴヌクレオチド。

【請求項4】ペクチネータス（*Pectinatus*）属菌とその進化的近縁細菌であるメガスフェラ（*Megasphaera*）属菌、ザイモフィラス（*Zymophilus*）属菌ならびにセレノモナス（*Selenomonas*）属菌を選択的に検出するため、ペクチネータス属菌の16S rDNAならびに16S rRNAを標的とする配列であって、そのオリゴヌクレオチドが配列表の配列番号8を有するか、または対応する相補鎖を有することを特徴とする一本鎖オリゴヌクレオチド。

【請求項5】請求項1～4に記載されたオリゴヌクレオチドの配列群より選択される配列中のいずれか10個の連続したヌクレオチド単位を有するオリゴヌクレオチドを含むか、または少なくとも90%相同であることを特徴とする一本鎖オリゴヌクレオチド。

【請求項6】トレーサーで標識されていることを特徴とする請求項1～5のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項7】固体支持体上に固定化されていることを特徴とする請求項1～5のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項8】試料から細菌を捕集する工程と、請求項1～7のいずれか一項に記載のものから選択されるオリゴヌクレオチドである1つまたは複数の核酸プローブと、適当なハイブリダイゼーション条件下に接触させる工程と、該プローブとサンプルの核酸との間のハイブリダイゼーション複合体の形成の有無を測定する工程からなること特徴とするペクチネータス属菌、またはその進化的近縁細菌の検出方法。

【請求項9】試料から細菌を捕集する工程と、請求項1～7のいずれか一項に記載のものから選択されるオリゴ

ヌクレオチドである1つまたは複数の核酸プローブと、適当なハイブリダイゼーション条件下に接触させる工程と、該プローブとサンプルの核酸との間のハイブリダイゼーション複合体の形成の有無を測定する工程からなること特徴とするペクチネータス属菌またはその進化的近縁細菌の同定方法。

【請求項10】細菌を捕集する方法が、遠心分離法またはメンブランフィルター捕集法のいずれかである、請求項8記載のペクチネータス属菌またはその進化的近縁細菌の検出方法。

【請求項11】細菌を捕集する方法が、遠心分離法またはメンブランフィルター捕集法のいずれかである、請求項9記載のペクチネータス属菌またはその進化的近縁細菌の同定方法。

【請求項12】ハイブリダイゼーション複合体の形成の有無を測定する方法が、FISH法（fluorescence in situ hybridization）、ドットブロット法、コロニーハイブリダイゼーション法、サザンブロット法、ノーザンブロット法のいずれかである請求項8記載のペクチネータス属菌またはその進化的近縁細菌の検出方法。

【請求項13】ハイブリダイゼーション複合体の形成の有無を測定する方法が、FISH法（fluorescence in situ hybridization）、ドットブロット法、コロニーハイブリダイゼーション法、サザンブロット法、ノーザンブロット法のいずれかである請求項9記載のペクチネータス属菌またはその進化的近縁細菌の同定方法。

【請求項14】数的に管理した対照細菌を試料中に意図的に混入させる工程と、請求項1～7のいずれか一項に記載のものから選択されるオリゴヌクレオチドである1つまたは複数の核酸プローブと、適当なハイブリダイゼーション条件下に接触させる工程と、該プローブとサンプルの細菌の核酸との間のハイブリダイゼーション複合体の形成の有無を測定する工程と、複合体形成のあった細菌と対照細菌の数から標的細菌の数を推定することを特徴とするペクチネータス属菌またはその進化的近縁細菌の定量方法。

【請求項15】ハイブリダイゼーション複合体の形成の有無を測定する方法がFISH法（fluorescence in situ hybridization）である請求項14記載のペクチネータス属菌またはその進化的近縁細菌の定量方法。

【請求項16】請求項1～5のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチドをポリメラーゼ存在下での核酸増幅のためのヌクレオチドプライマーとして使用する方法。

【請求項17】請求項10に記載の方法で増幅させた核酸を、電気泳動法および核酸染色法により検出する方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、ビール有害菌であるペクチネータス（*Pectinatus*）属菌またはその進化的

近縁細菌の検出、または該細菌の同定、または該細菌の定量に関する。

【0002】

【従来の技術】近年のビールの生（なま）化への流れは、ビール鮮度という新たな価値観をもたらした。こうした背景から、ビール製造会社にとっては、製品製造から出荷までの時間を劇的に短縮するために、ビール有害菌の汚染を迅速に正確に判定する必要性が高まっている。

【0003】偏性嫌気性菌である、ペクチネータス（*Pectinatus*）属菌とその進化的近縁細菌であるメガスフェラ（*Megasphaera*）属菌、セレノモナス（*Selenomonas*）属菌、ザイモフィラス（*Zymophilus*）属菌は、ビール醸造技術の進展に伴う製品ビールの嫌気度が高まるにつれ検出頻度が高まり、特にペクチネータス属菌は1990年代に入り発生した幾つかの製品事故の原因菌として同定されている。

【0004】従って食品業界、特にビール業界において使用できる、ペクチネータス属菌の迅速かつ選択的な検出を可能とするのに十分特異的で感度の高い細菌診断試験法を開発することは重要である。古典的なビール有害細菌の同定は、形態観察、グラム染色性、カタラーゼ試験などの多くの性状ならびに生化学的試験を行い、最終的に新鮮なビールに単離した細菌を再摂取し、その増殖能の観察を行うことにより決定していた。これらの一連の操作は、多くの時間と労力を要すると同時に正確な判定も困難な場合が多かった。また、最近では、ペクチネータス属菌のより迅速な検出・同定法についていくつか検討されており、例えば抗原抗体反応を利用したペクチネータス属菌の検出法（*J. Am. Soc. Brew. Chem.*: 51 (4) 158-163, 1993）やペクチネータス属菌からDNAを抽出して特定のオリゴヌクレオチドをプライマーとしてPCR（Polymerase Chain Reaction）を行い、標的配列を増幅させた後、ペクチネータス属菌特有の核酸の有無を判定する方法（特再平09-820071）がある。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】しかし、これらの方法は抗原、または標的核酸が存在すれば陽性に判定させるものであり、既にビール生育性がないか、もしくは活性の著しく弱い細菌とビール生育能を依然として保持している細菌とを区別できない。また、PCR法で再現よく、十分な感度を得るには、必要最小量の細菌核酸を獲得するための適当な培養と核酸抽出ならびに遺伝子増幅という予備工程を必要とする。なぜならば、細菌の核酸量は極めて微量であり、非常に低濃度の核酸は効率よく抽出できないこと、または標的核酸は1細菌ゲノムあたり数コピーでしか存在しないからである。

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明の1つの目的は、ビール混濁の原因となるが混濁しないビールには存在し

ない生物のリボゾームRNA（rRNA）およびリボゾームDNA（rDNA）中の独特の核酸配列に相補的なオリゴヌクレオチドを提供するものである。

【0007】本発明の別の目的は、上記で挙げた欠点を、特異性、感度および速度を併有する核酸ハイブリダイゼーション下においてアクセス可能とされ得る標的領域にハイブリダイズすることができる核酸オリゴヌクレオチドを提供することである。

【0008】本発明の別の目的は更に、適当なトレーサーで標識したこれらのオリゴヌクレオチドをプローブとして機能させて、ハイブリダイゼーションを行い、当該細菌を選択的に検出同定ならびに定量する方法を提供することである。

【0009】

【発明の実施の形態】細菌リボゾームは5S、16Sおよび23SrRNAと呼ばれる少なくとも3種類のRNA分子を含む。歴史的にこれらの名称は、沈降速度で決定されるRNA分子の大きさに関係している。本発明において、細菌のリボゾームRNA（rRNA）は、標的として使用できる。この使用の利点の一つは、rRNAが生きている細胞全てに豊富に存在するという点である。

【0010】本発明をより詳細に開示する前に、本明細書で使用する種々の用語を下記のように定義する。「オリゴヌクレオチド」または「オリゴヌクレオチド断片」は天然の（または所望により修飾された）核酸の情報配列によって特徴づけられ、かつ天然の核酸と同様に、予め定めた条件下で、相補的または実質的に相補的なヌクレオチド断片とハイブリダイズ可能であるヌクレオチド単位の鎖を示す二つの同義用語である。その鎖は天然の核酸とは異なる構造のヌクレオチド単位を含みうる。例えば、オリゴヌクレオチドの構成単位である核酸が天然に存在する核酸に見られるホスホジエステルでなく、他のエステル結合、またはアミド結合（一般にPNAと呼ばれる）で結合したものであって、標的領域にハイブリダイズできるものであればよい。オリゴヌクレオチド（または、ヌクレオチド断片）は、例えば、100までのヌクレオチド単位を含みうる。一般には、少なくとも10個のヌクレオチド単位を含み、天然の核酸分子から、または遺伝子組換えによって、または化学合成によって得ることができる。

【0011】「ハイブリダイゼーション」は、適切な条件下で、十分に相補的な配列を有するヌクレオチド断片同士が、安定かつ特異的な水素結合によって結合して二本鎖を形成することと理解される。ハイブリダイゼーションの条件は、「ストリンジェンシー」すなわち反応条件の厳しさによって決定される。ハイブリダイゼーションを行うときのストリンジェンシーが高いほど、特異性は高い。つまり、適切なハイブリダイゼーション条件とは、特にプローブ・標的二本鎖の塩基組成、ならびに2

個の核酸の間の不一致度から決定され、ハイブリダイゼーション溶液に存在するイオン種の濃度および種類、変性剤の性質および濃度、またはハイブリダイゼーション温度などのハイブリダイゼーション反応パラメーターの関数として表現される。ハイブリダイゼーション反応を行うときの条件のストリンジェンシーは、特に、使用するプローブに依存する。これら全てのデータは周知であり、適切な条件は、通常の技術者の能力の範囲内において、ルーチン実験により各ケースで決定され得る。

【0012】また、「相同である」とは、2個またはそれ以上の核酸配列間の類似の度合いを表すことを意味し、生物間の分類学的な類似度合いを意味するものではない。類似の度合いはパーセンテージで表し、例えば2個の配列間が90%相同であるとは、第1の配列の塩基の90%が第2の配列の塩基と同一にマッチすることを意味する。

【0013】「プローブ」は、決められた条件下でハイブリダイゼーション特異性を有して、本発明の場合は、リボソームRNA、またはリボソームDNA (rDNA) に含まれるヌクレオチド配列を有する標的核酸とハイブリダイゼーション複合体を形成する、例えば、10~100個のヌクレオチド単位、特に12~35個のヌクレオチド単位を含むヌクレオチド断片である。プローブは、検出、同定、定量目的に使用することができる。例えば、放射性同位体、酵素、特に、色素原性、蛍光性または発光性基質に作用し得る酵素（特に、ペルオキシダーゼまたはアルカリホスファターゼ）、色素産生化学化合物、色素原性、蛍光性もしくは発光性化合物、ヌクレオチド塩基の類似体およびビオチンなどのリガンドから選択されるマーカーによって標識できる。

【0014】「プライマー」は、例えば10~100ヌクレオチド単位を含み、かつ例えばPCR（ポリメラーゼ連鎖反応）などの増幅法、配列決定プロセス、逆転写法などにおける酵素的重合の開始のための決められた条件下でハイブリダイゼーション特異性を有するオリゴヌクレオチドである。

【0015】本発明に係るオリゴヌクレオチドは、サンプル中の標的核酸の有無の試験において、公知の全てのハイブリダイゼーション技術、特に「ドットプロット」と呼ばれるフィルター上での点付着の技術 (MANIATISら、Molecular Cloning, Cold Spring Harbor, 1982)、「サザンプロット」と呼ばれるDNA移動の技術 (SOUTHERN E.M., Mol. Biol., 98, 503 (1975))、「ノーザンプロット」と呼ばれるRNA移動の技術に従って使用することができる。

【0016】本発明によれば、(1)他の種と比較して、ペクチネータス・フリシンジェンシス (*P. frisingensis*) と優先的にハイブリダイズする；(2)他の種と比較して、ペクチネータス・セレビスフィラス (*P. cerevisiophilus*) と優先的にハイブリダイズする；(3)

他の属と比較して、ペクチネータス属菌 (*P. frisingensis*, *P. cerevisiophilus*) に優先的にハイブリダイズする；(4)他の属と比較して、ビール混濁の原因となるペクチネータス属菌、メガスフェラ (*Megasphaera*) 属菌、ザイモフィラス (*Zymophilus*) 属菌、またはセレノモナス (*Selenomonas*) 属菌に優先的にハイブリダイズする、約10~100のヌクレオチド断片が提供される。本発明のヌクレオチド断片は、ビールの混濁の原因となる生物の存在を検出するために有用である。上記ヌクレオチドの少なくとも10個の連続した核酸に対して相補的であるか、またはそれと少なくとも90%相同であるプローブもまた、本発明に含まれる。

【0017】本発明の1つは、ビール混濁有害菌の16S rRNAまたはrDNAの特定領域に対して相補的であるか、またはそれにハイブリダイズするオリゴヌクレオチドおよびプローブについてである。詳しくは、その核酸は配列表の配列番号1~8に示すプローブ群により定義される配列の群から選択される配列中のいずれか10個の連続したオリゴヌクレオチドを含む配列の少なくとも90%に対して相補的であるかまたはそれと相同である。具体的には、(1)の核酸は、配列番号1~3の少なくとも1つの、(2)の核酸は配列番号4および/または5の、(3)の核酸は配列番号6および/または7の、そして(4)の核酸は配列番号8のオリゴヌクレオチドである。プローブの設計は16S rRNAデータベース (RDP, Larsen et al., 1993) とGene Bankデータライブラリーから公開されている遺伝子配列情報を基に行った。

【0018】本発明のもう一つは、ビール混濁細菌の存在を検出するための方法である。この方法は、標的細菌を含んでいる疑いのあるサンプルを少なくとも1種類の核酸と接触させる工程を含む。この核酸は、(1)ペクチネータス・フリシンジェンシスの；(2)ペクチネータス・セレビスフィラスの；(3)ペクチネータス属菌 (*P. frisingensis*, *P. cerevisiophilus*) の；(4)ビール混濁の原因となるペクチネータス属菌、メガスフェラ属菌、ザイモフィラス属菌、またはセレノモナス属菌のいずれかの；rRNAまたはrDNAと優先的にハイブリダイズする約10~100ヌクレオチドを有する。

【0019】この方法は、核酸プローブが標的rRNAまたはrDNAと優先的に結合して核酸複合体を形成するようにハイブリダイゼーション条件を試料に付与し、そして標的生物（1または2以上）の存在を指示するものとして複合体を検出する工程を含む。好ましくは、本核酸プローブは配列番号1~8に示すプローブ群により定義される配列の群から選択される配列中のいずれか10個の連続したオリゴヌクレオチドを含む配列の少なくとも90%に対して相補的であるかまたはそれと相同である。

【0020】本発明のプローブは、ビール及びビール製

造途中の半製品または、ビール醸造場や下水などの環境下から採取された試料中のビール混濁生物の特異的検出のための核酸ハイブリダイゼーションアッセイ開発の基礎を提供する。本発明のプロブはまた、ビール混濁有害菌の存在を確認するための基礎を提供する。本発明のプロブの開発に際して最初にとられたステップは特異的核酸プロブに対して、標的とするビール有害菌の16S rRNA内の特異な領域を同定することであった。これは、16S rRNA内のどの標的領域が、

(1) ビール混濁の原因となるペクチネータス・フリシンジェンシスの；(2) ペクチネータス・セレビシフィラスの；(3) ペクチネータス属菌 (*P. frisingensis*, *P. cerevisiophilus*) の；(4) ビール混濁の原因となるペクチネータス属菌、メガスフェラ属菌、ザイモフィラス属菌、またはセレノモナス属菌の、いずれに対して特異的であるかを見いだすことであった。

【0021】そこで、これらの実現のためペクチネータス・フリシンジェンシスならびにペクチネータス・セレビシフィラスの16S rDNAの配列を公知の実験プロトコールにより決定し、ペクチネータス属菌の進化的近隣細菌であるメガスフェラ属菌、ザイモフィラス属菌ならびにセレノモナス属菌、またはビール有害菌として知られるラクトバシルス (*Lactobacillus*) 属菌、または大腸菌 (*E. coli*) を含む他の細菌16S rDNAの配列と比較した。この結果を基に、(1) ビール混濁の原因となるペクチネータス・フリシンジェンシスの；

(2) ペクチネータス・セレビシフィラスの；(3) ペクチネータス属菌 (*P. frisingensis*, *P. cerevisiophilus*) の；(4) ビール混濁の原因となるペクチネータス属菌、メガスフェラ属菌、ザイモフィラス属菌、またはセレノモナス属菌の、いずれかに対して特異的なプロブを配列表1~8のごとく設計した。具体的には、

(1) の核酸は、配列番号1~3のいずれかの、(2) の核酸は配列番号4または5の、(3) の核酸は配列番号6または7の、そして(4) の核酸は配列番号8のオリゴヌクレオチドである。

【0022】本発明のプロブはfluorescence in situ hybridization (以下FISHと略す) に用いることができる。ビール及びビール製造途中の半製品または、ビール醸造場や下水などの環境下から採取された試料を、遠心分離またはビール有害細菌を捕捉可能なメンブレンフィルター処理し、試料中に存在するかもしれない標的ビール混濁有害菌と検出プロブとを適切なハイブリダイゼーション条件下で接触させる。検出プロブは標的細菌内の細胞質内に侵入し、そこに存在する16S rRNA内の標的部位に適切なハイブリダイゼーション条件下でアクセスし、ハイブリダイズする。この際に、検出プロブを、放射性同位元素、蛍光物質、化学発光物質等のトレーサー標識をすることで特異的なハイブリダイゼーションの現象を適当な手法によってモニタリングするこ

とができる。たとえば、検出プロブが放射性同位元素で標識されている場合にはオートラジオグラフィ等の方法によってアッセイを実施し、蛍光物質で標識されている場合には蛍光顕微鏡等でのアッセイやCCDカメラを用いたデジタル解析を実施し、化学発光物質で標識されている場合には感光フィルムを用いた解析やCCDカメラを用いたデジタル解析を実施し、標的生物の存在の有無を判定することができる。

【0023】上記で定義したオリゴヌクレオチドはまた、公知の方法で耐熱性ポリメラーゼの存在下、ペクチネータス属菌、ペクチネータス属菌の少なくとも1種、またはペクチネータス属菌の進化的近縁細菌の16S rDNAもしくは16S rRNAを増幅合成するための特異的プライマーとして使用することができる (PCR, RT-PCRなど)。使用するプライマーの組み合わせと適切な反応プログラムの設定により、目的とする核酸が増幅されるかどうかの結果から標的細菌の存在の有無もまた判定可能である。

【0024】

【実施例】本発明を下記実施例により説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

実施例1 FISH法によるビール有害細菌の検出・同定
ビール及びビール製造途中の半製品または、ビール醸造場や下水などの環境下から採取された試料からの細菌の捕集は以下の2つの手法を用いて行った。

【0025】(1) 遠心分離法による捕集

供試サンプル50mlを遠心チューブに入れ、遠心分離 (10,000Xg、10分間、4℃) を行い、上清液を捨て細菌ペレットを回収後、さらに30mlのPBS溶液で同条件で遠心分離し洗浄を行った。洗浄後、細菌ペレットを1mlの固定液 (4% w/vのパラホルムアルデヒドを含むPBS) に再けん濁し、4℃で5時間固定した。細菌を固定後、さらに遠心分離により細菌細胞を2回洗浄処理後、適当量の50% v/vのエタノールを含むPBSに再けん濁し、FISHに供する細菌液を得た。これらの細菌液をゼラチンでコーティングしたスライドガラス上に一滴のせ風乾後、70%エタノール液、続いて99%エタノール液中にそれぞれ2分間静置し、脱水処理を行い、FISHに供する試験標本とした。FISHに用いるプロブは、5' 端をFITC (fluorescein isothiocyanate) 標識した蛍光プロブを常法により合成したものを使用した。FISHは、50pmolの蛍光プロブを含むハイブリダイゼーション液 (0.9M NaCl, 0.05% SDS, 20mM Tris, 5mM EDTA, 10%ホルムアミド, pH 7.6) 20μlを上記した試験標本に接触させ、高湿度を保ったチャンバー内で40℃、2時間行った。洗浄は、以下の通り行った。42℃の上述したハイブリダイゼーション液中に20分間、試験標本を静置後、常温の滅菌蒸留水ですすぎ、余分な蛍光プロブを除去した。このハイブリダイゼーションと洗浄を終えた試験標本を風乾後、10μg/mlのDAPIを含む褪色防止剤

(SlowFade™: Molecular Probe社)を用いて、全細胞を染色し、蛍光顕微鏡で観察した。

【0026】(2)メンブレンフィルターによる捕集
供試サンプル150mlをポリカーボネート製のメンブレンフィルター(直径47mm、孔径0.4μm)で吸引濾過した後、50mlのPBSで2回洗浄した。続いて10mlのハイブリダイゼーションバッファー(0.9M NaCl, 0.05% SDS, 20mM Tris, 5mM EDTA, 10%ホルムアミド, pH 7.6)で洗浄し、FISHに供試した。FISHは、50pmolの蛍光プローブを含むハイブリダイゼーション液(0.9M NaCl, 0.05% SDS, 20mM Tris, 5mM EDTA, 10%ホルムアミド, pH 7.6)200μlをプラスチックシャーレに滴下し、この上に菌体の捕捉されている面が上になるようにフィルターを接触させ、高湿度を保ったチャンバー内で40℃、2時間行った。洗浄は、以下の通り行った。ハイブリダイゼーションの終わったフィルターを吸引濾過装置にセットし、42℃のハイブリダイゼーションバッファー100ml、続いて常温のフィルター濾過した滅菌水50mlを用いて吸引洗浄した。ハイブリダイゼーションと洗浄を終えたメンブレンフィルターを

無菌的に風乾後、無蛍光スライドガラス上に細菌捕捉面を上にしてのせ、さらにこの面に直接10μg/mlのDAPIを含む褪色防止剤(SlowFade(登録商標): Molecular Probe社)をのせ、全細胞を染色し、カバーガラスでフィルターを覆い蛍光顕微鏡で観察した。観察画像を図1に示す。

【0027】FITC標識した特異的プローブを用いてFISH解析を行い、蛍光顕微鏡下で観察するとターゲットとなる菌全体がFITC特有の蛍光を発しているのが見える。例えば、FITC標識した配列番号1の相補鎖プローブを用いてin situハイブリダイゼーションを行うと、図に示すようにペクチネータス・フリシンジェンシスは蛍光標識されて検出されるが、ペクチネータス・セレビシフィラスは検出されない。上述した2つの手法は完全に一致し、その結果、FISH法でのプローブの特異性は表1の通りであった。表中、○は反応性あり、×は反応性なしを示す。

【0028】

【表1】

菌種	菌株名	プローブ(配列番号) No.							
		1	2	3	4	5	6	7	8
<i>Pectinatus frisingensis</i>	DSM6306	○	○	○	×	×	○	○	○
<i>Pectinatus cerevisiophilus</i>	DSM20467	×	×	×	○	○	○	○	○
<i>Megasphaera cerevisiae</i>	DSM20462	×	×	×	×	×	×	×	○
<i>Selenomonas lactificex</i>	DSM20757	×	×	×	×	×	×	×	○
<i>Zymophilus pausivorans</i>	DSM20756	×	×	×	×	×	×	×	○
<i>Zymophilus raffinovorans</i>	DSM20765	×	×	×	×	×	×	×	○
<i>Lactobacillus brevis</i>	JCM1059	×	×	×	×	×	×	×	×
<i>Lactobacillus casei</i>	ATCC334	×	×	×	×	×	×	×	×
<i>Lactobacillus corniformis</i>	JCM1164	×	×	×	×	×	×	×	×
<i>Lactobacillus lindneri</i>	DSM20690	×	×	×	×	×	×	×	×
<i>Lactobacillus plantarum</i>	JCM1149	×	×	×	×	×	×	×	×
<i>Lactococcus lactis</i>	JCM5805	×	×	×	×	×	×	×	×
<i>Leuconostoc lactis</i>	JCM6123	×	×	×	×	×	×	×	×
<i>Pediococcus damnosus</i>	JCM5886	×	×	×	×	×	×	×	×
<i>Escherichia coli</i>	K-12	×	×	×	×	×	×	×	×

【0029】また、複数のプローブを同時に用いる手法もある。例えば、プローブ1とプローブ2を同時にFISH解析に供試すると、プローブ1とプローブ2はそれぞれ16SrRNA内の標的領域が異なるため、加算的にシグナルの増強ができた。このように、本発明によって得たプローブを検出したい標的目標に応じて、組み合わせることは有用であった。

【0030】**実施例2** FISH法によるペクチネータス属菌の定量

試料中のペクチネータス属菌の定量は下記の通り行った。実施例1のごとく試料中の細菌を捕集する直前に、バクトメーターを用いて直接計数管理した大腸菌を試料中に添加し、FISH解析結果を分析することにより得た。例えば、ペクチネータス・フリシンジェンシスに汚染されたビールに対し、直接計数法によって管理した大腸菌(C個)を混入させ、ペクチネータス・フリシンジェンシスの16S rRNAに特異的な配列表の配列番号1に示す蛍

光標識プローブを用いて実施例1のごとくFISH解析を行った。得られる蛍光画像から、図2のごとくDAPIに染まった菌数(A)とFITC標識された菌数(B)を決定し、ビール中に存在したペクチネータス・フリシンジェンシスの数を推定できる。

【0031】蛍光顕微鏡観察により、蛍光を発しない細胞(大腸菌)と発する細胞(ペクチネータス・フリシンジェンシス)の比率からペクチネータス・フリシンジェンシスを定量できる。例えば、ペクチネータス・フリシンジェンシス単独に汚染された試料に10⁷個の大腸菌を添加して回収した検体に対し、蛍光標識した配列番号1の相補鎖プローブを用いてFISH解析を行った場合、蛍光標識されない大腸菌1000個に対し、蛍光標識された細胞(ペクチネータス・フリシンジェンシス)が10個認められると、ペクチネータス・フリシンジェンシスはもとの試料中に10⁵個存在したことになる。すなわち、試験に供したビール中に存在したペクチネータス・フリシンジ

ェンシス数 (N) は以下の関係式で表すことができる。

$$【0032】 N = B \times C / A - B$$

また、ペクチネータス属菌の他、複数の種の細菌によって汚染された試料については、上述した大腸菌の代わりに試料中に存在しない細菌をカウンター株として用いることによって、特定のペクチネータス属菌の試料中の菌数を推定できる。使用しようとするカウンター株が試料中に存在するか否かは、PCR法による判定から容易に知ることができた。例えば、ペクチネータス・フリシンジェンシスとそれ以外の複数種の微生物に汚染されているが、ペクチネータス・セレビシフィラスに汚染されていないビール中のペクチネータス・フリシンジェンシス数を知りたい場合を例をとり、以下に説明する。ペクチネータス・フリシンジェンシスを含む複数種の微生物汚染ビールに対し、直接計数法によって管理したペクチネータス・セレビシフィラス (C個) を混入させ、ペクチネータス・フリシンジェンシスの16S rRNAに特異的な配列番号1に示す蛍光標識プローブとペクチネータス・セレビシフィラスの16S rRNAに特異的な配列番号4に示すローダミンで標識したプローブの共存下に、実施例1のごとくFISH解析を行った。得られた蛍光画像からローダミン標識された菌数 (A) とFITC標識された菌数 (B) を決定し、汚染ビール中に存在したペクチネータス・フリシンジェンシスの数の推定が可能であった。す

なわち、試験に供したビール中に存在したペクチネータス・フリシンジェンシス数 (N) は以下の関係式で表すことができる。

$$【0033】 N = B \times C / A$$

ここで、カウンター株の16S rRNAと特異的にハイブリダイズするプローブの標識物質は標的細菌特異的なプローブの標的物質と識別できるものであれば良い。

【0034】実施例3 ドットプロットによるペクチネータス属菌の同定

市販品として入手可能なニトロセルロース、ナイロン、PVDF等のフィルター上に細菌試料から公知の手法により抽出した核酸を固定化した。目的に応じて、プローブはベーリンガー・マンハイム社のDIGオリゴヌクレオチドテイルングキットを用いて標識し、ハイブリダイゼーションに供した。検出は、ベーリンガー・マンハイム社のDIG発光検出キットを用い、その手順書に従って行い、最終的にフィルターを適当な時間X線フィルムに露光し、ハイブリダイゼーションシグナルの有無から、ペクチネータス属菌の種の同定を行った。ドットプロットの結果を表2に示す。表中、●：反応性あり。○：反応性なし。

【0035】

【表2】

菌種	菌株名	プローブ(配列番号) No.							
		1	2	3	4	5	6	7	8
<i>Pectinatus frisingensis</i>	DSM6306	●	●	●	○	○	●	●	●
<i>Pectinatus cerevisiophilus</i>	DSM20467	○	○	○	●	●	●	●	●
<i>Megasphaera cerevisiae</i>	DSM20462	○	○	○	○	○	○	○	●
<i>Selenomonas lacticifex</i>	DSM20757	○	○	○	○	○	○	○	●
<i>Zymophilus pausivorans</i>	DSM20756	○	○	○	○	○	○	○	●
<i>Zymophilus raffinivorans</i>	DSM20765	○	○	○	○	○	○	○	●
<i>Lactobacillus brevis</i>	JCM1059	○	○	○	○	○	○	○	○
<i>Lactobacillus casei</i>	ATCC334	○	○	○	○	○	○	○	○
<i>Lactobacillus corniformis</i>	JCM1164	○	○	○	○	○	○	○	○
<i>Lactobacillus lindneri</i>	DSM20690	○	○	○	○	○	○	○	○
<i>Lactobacillus plantarum</i>	JCM1149	○	○	○	○	○	○	○	○
<i>Lactococcus lactis</i>	JCM5805	○	○	○	○	○	○	○	○
<i>Leuconostoc lactis</i>	JCM6123	○	○	○	○	○	○	○	○
<i>Pediococcus damnosus</i>	JCM5886	○	○	○	○	○	○	○	○
<i>Escherichia coli</i>	K-12	○	○	○	○	○	○	○	○

【0036】

【配列表】

<110> Asahi Breweries Ltd.

<120> A nucleic acid probe for detecting *Pectinatus* bacteria and a method for detecting beer turbidity bacteria

<130> 99T3-33

13

14

<160> 8
<210> 1
<211> 20
<212> DNA
<213> *Pectinatus frisingensis*
<400> 1
cggaacatta agcgatctt
<210> 2
<211> 20
<212> DNA
<213> *Pectinatus frisingensis*
<400> 2
gggtccgaac tgaggttctt
<210> 3
<211> 20
<212> DNA
<213> *Pectinatus frisingensis*
<400> 3
gagaccgcga ggtggagcga

<210> 4
<211> 20
<212> DNA
<213> *Pectinatus cerevisiiphilus*
<400> 4
cggatgacta agcgatctt
<210> 5
<211> 20
<212> DNA
<213> *Pectinatus cerevisiiphilus*
<400> 5
ggattcgaac tggatctt
<210> 6
<211> 20
<212> DNA
<213> *Pectinatus frisingensis*
<400> 6
cggctaagg cgcgaaggca
<210> 7
<211> 20
<212> DNA

<213> Pectinatus frisingensis
 <400> 7
 ggcttttagc tatcgcttgg
 <210> 8
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Pectinatus frisingensis
 <400> 8
 cgaaagtcac ccacaccga

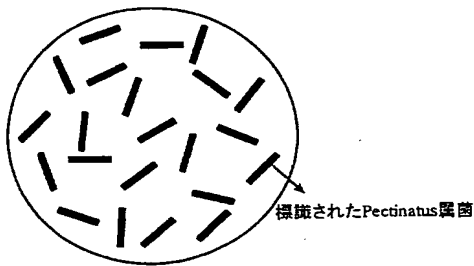
【図面の簡単な説明】

【図1】 FISH法によるPectinatus属菌の検出結果の蛍

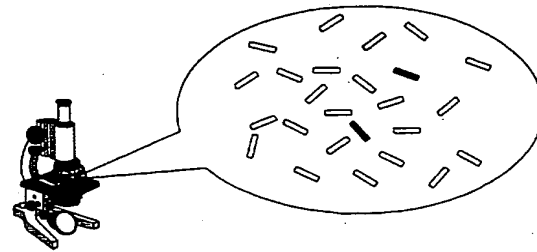
光顕微鏡観察画像。

【図2】 Pectinatus属菌の定量方法を示す図。

【図1】



【図2】



フロントページの続き

(51) Int. Cl.⁷

(C 1 2 Q 1/68

C 1 2 R 1:01)

識別記号

F I

C 1 2 N 15/00

C 1 2 R 1:01)

テーマコード (参考)

Z N A A